

抗-Cry2Aa 单链抗体分子互作及荧光免疫检测研究

王耘¹, 武爱华², 张存政², 刘贤金²

(1. 金陵科技学院园艺学院, 江苏南京 210038)

(2. 江苏省农业科学院食品质量与安全检测研究所农业部食品质量安全监控重点开放实验室, 江苏南京 210014)

摘要: Cry2Aa 毒素是一种新型生物农药, 分析该毒素与特异性单链抗体分子互作, 并建立快速检测毒素残留的方法对保障食品和生态安全有重要意义。本研究以同源蛋白为模板对单链抗体进行建模, 并进行了 Cry2Aa 毒素与单链抗体的分子对接模拟, 确定关键结合位点, 以此为基础将单链抗体作为检测抗体, 建立了间接竞争时间分辨荧光免疫分析方法, 对大米样品中 Cry2Aa 毒素进行了检测。利用生物信息学工具模拟获得单链抗体三维结构模型, 分子对接结果显示重链可变区⁸¹NY⁸²和¹²¹SGNY¹²⁴区域及轻链可变区的²⁴⁵YSSN²⁴⁸氨基酸残基在与毒素结构 II 区识别过程中起关键作用, 为建立高效检测方法奠定基础, 进一步基于该单链抗体建立的时间分辨检测方法灵敏度(IC₁₀)为 0.08 ng/mL, 中抑制浓度(IC₅₀)为 7.99 ng/mL, 线性检测范围(IC₂₀~IC₈₀)为 0.24~263.77 ng/mL, 且与常规双抗夹心 ELISA 法检测呈良好线性关系。

关键词: Cry2Aa 毒素; 单链抗体; 时间分辨荧光免疫分析; 同源建模; 分子对接

文章编号: 1673-9078(2017)6-309-312

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.6.045

Time-resolved Fluorescence Immunoassay and Molecular Recognition

Mechanism of the Single Chain Variable Fragment against the Cry2Aa

Toxin

WANG Yun¹, WU Ai-hua², ZHANG Cun-zheng², LIU Xian-jin²

(1. College of Horticulture, Jinling Institute of Technology, Nanjing 210038, China) (2. Institute of Food Quality Safety and Detection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Control Technology and Standard for Agro-product Safety and Quality, Ministry of Agriculture, Nanjing 210014, China)

Abstract: Cry2Aa toxin is a new type of biopesticide, and analysis of the interactions between this toxin and a specific single chain variable fragment (scFv) to enable the establishment of a rapid method for toxin-residue detection is important for maintenance of food and ecological security. Here, a homologous protein was used as a template for modeling the three-dimensional structure of anti-Cry2Aa scFv in order to allow simulations of molecular docking between Cry2Aa and scFv and determination of key binding sites. The results showed that scFv was suitable for use as an antibody to establish an indirect competitive time-resolved fluorescence immunoassay (IC-TRFIA), which was applied for the detection of Cry2Aa toxin in rice samples. The three-dimensional structure of scFv was modeled and refined using bioinformatics tools. The molecular-docking results showed that the amino acid residues of the heavy chain variable regions⁸¹NY⁸² (V_H-CDR2) and¹²¹SGNY¹²⁴ (V_H-CDR3) and the light chain variable region²⁴⁵YSSN²⁴⁸ (V_L-CDR3) played important roles in the recognition of the Cry2Aa domain, providing a basis for the establishment of a highly efficient detection method. The limit of the detection was 0.08 ng/mL, the 50% inhibition rate was 7.99 ng/mL, and the linear range (IC₂₀~IC₈₀) was from 0.24 ng/mL to 263.77 ng/mL. Furthermore, IC-TRFIA results and those of conventional double-antibody sandwich ELISA showed good linear correlation.

Key words: Cry2Aa toxin; single chain variable fragment (scFv); time-resolved fluorescence immunoassay (TRFIA); homology modeling; molecular docking

收稿日期: 2016-09-09

基金项目: 江苏省自然科学基金青年基金资助项目(BK20150114); 江苏省高校自然科学研究自助项目(14KJB210004); 金陵科技学院博士启动项目(jit-6-201518); 金陵科技学院校级科研基金孵化项目(C140501)

作者简介: 王耘(1985-), 女, 博士, 讲师, 主要从事农产品检测与质量控制

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 是使用较为广泛的生物农药^[1], 其杀虫活性主要来源于芽孢形成过程中产生的 Cry 毒素晶体蛋白。其中 Cry2Aa 毒素与 Cry1 类毒素基本没有交互抗性, 目前害虫抗性低, 因此被作为新型转基因的靶标蛋白使用。高效的检测方法可以为研究 Cry2Aa 毒素蛋白对食品和环境安全性的影响、监测残留动态提供依据^[2,3]。

噬菌体展示技术为检测方法的研究提供了便捷的工具^[4], 简化了抗体制备过程^[5], 但是噬菌体展示技术淘选获得的单链抗体 (single chain variable fragment, scFv) 往往免疫检测灵敏度不及传统抗体且表达量较低, 因此其作为检测抗体的应用受到限制。而时间分辨荧光免疫分析技术 (Time-resolved fluorescence immunoassay, TRFIA) 具有超高灵敏度可以克服上述单链抗体的不足^[6]。目前利用该技术针对 Cry 毒素建立的检测有少量报道^[7], 本研究以单链抗体为检测抗体建立了高效的检测方法。

同时, 毒素的结合机理也是现在研究的热点^[8], 目前对 Cry2Aa 毒素抗体结构和抗原-抗体识别机制的研究尚不深入, 且采用实验方法解析抗原-抗体复合物的结构还存在较大的困难。因此, 利用蛋白质相关的数据库资源及同源建模和分子对接辅助手段进行生物信息学分析不仅可以模拟和预测蛋白质的理化性质、空间结构和生物活性, 而且能够解析表位上关键氨基酸所在结构域位置和理化性质对毒素-抗体复合物的结构和功能的影响^[9,10]。本研究通过同源建模, 模拟了抗-Cry2Aa 单链抗体的三维结构, 利用分子对接技术考察了单链抗体与 Cry2Aa 的结合模式, 探寻了结合区域的关键氨基酸位点, 为分析抗体-抗原互作模式, 改造抗体结构提供了信息, 更为研究 Bt 毒素受体作用位点及作用机制提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

抗 Cry2Aa 毒素单链抗体: 本实验室从 Tomlinson 文库中筛选获得; Cry2Aa 毒素蛋白标品购自上海佑隆生物科技有限公司; Eu-N1 由芬兰图尔库大学 Timo Lövgren 教授惠赠; TRFIA 检测缓冲液、荧光增强液、洗液由江原实业技贸总公司黄飙博士惠赠; anti-His 抗体购自 Abbkine 公司; LB940 多功能微孔板分析仪购自德国 Berthold 公司。

1.2 单链抗体序列比对及同源建模

在 Protein Data Bank 数据库中通过 BLAST 搜索

(http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do#Subcategory-search_sequences) 建立抗 Cry2Aa 单链抗体的模板, 选择评分高的蛋白质结构序列作为候选模板以期建立模型。利用 SWISS-MODEL 建立抗 Cry2Aa 单链抗体的分子模拟结构。模建结构采用 Procheck 程序的 Ramachandran plot 以及 verify3D 进行打分, 评价三维结构与其一级序列的兼容性。

1.3 分子对接及氨基酸结合热点预测

根据 PDB 蛋白库中 Cry2Aa 晶体结构 (PDB ID:1I5P) 及建模的单链抗体, 利用 ZDOCK 进行抗体与毒素蛋白的对接, 获取抗原-抗体复合体结构, 再结合 cons-PPISP 和 Hotpoint 预测结果, 确定抗原-抗体关键氨基酸结合位点。

1.4 标准曲线的建立

Eu-N1 标记 anti-His 抗体参照之前的步骤^[11]。采用间接竞争 TRFIA 建立标准曲线, 通过优化条件最终确定抗原包被浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$, 将 Cry2Aa 毒素标样从 2 $\mu\text{g/mL}$ 开始往下五倍稀释 8 个浓度与纯化的 scFv (5 $\mu\text{g/mL}$) 等体积预孵育过夜后加入酶标板室温孵育 1 h, 洗涤后每孔加入 100 μL (500 倍稀释) 的 Eu-N1 标记的 anti-His 抗体, 室温下孵育 1 h。洗板后 100 μL /孔加入荧光增强液, 于室温下孵育 45 min, 在多功能微孔板分析仪上进行读数。以 Cry2Aa 毒素浓度的对数为 X 轴, 以抑制率为 Y 轴绘制标准曲线。并计算抗体的抑制中浓度、最低检测限和检测线性范围。

1.5 添加回收试验

将大米样品粉碎, 取 1.2 g 于离心管中添加 Cry2Aa 毒素, 添加终浓度分别为 100 ng/mL、50 ng/mL、25 ng/mL 和 5 ng/mL, 充分吸附。每管加入 1 mL 样品提取液, 以 100 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 提取过夜, 次日 5000 r/min 离心 5 min, 每个样品重复 3 次, 吸取上清液采用上述方法进行测定。同时用商业双抗夹心试剂盒做对照试验。

1.6 数据统计分析

采用 SPSS 软件进行数据统计分析且以 $M \pm SD$ 表示试验数据。

2 结果

2.1 抗体可变区空间结构预测

单链抗体同源建模 BLAST 序列比对后, 选取

PDB IDs:2GHW 为模板,其序列一致性为 75%,通过 SWISS-MODEL 建模,选取稳定模型,该模型由反向平行 β 折叠和环状结构构成,具有单链抗体的典型构象(图 1)。

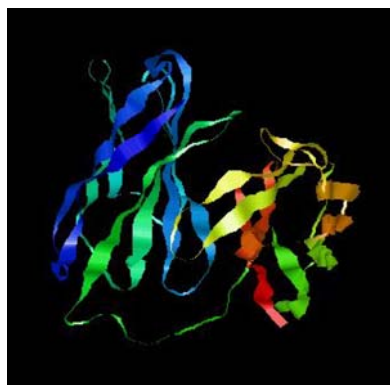


图 1 Cry2Aa 单链抗体三维结构

Fig.1 3D model of the Cry2Aa scFv antibody

2.2 模型优化及评价

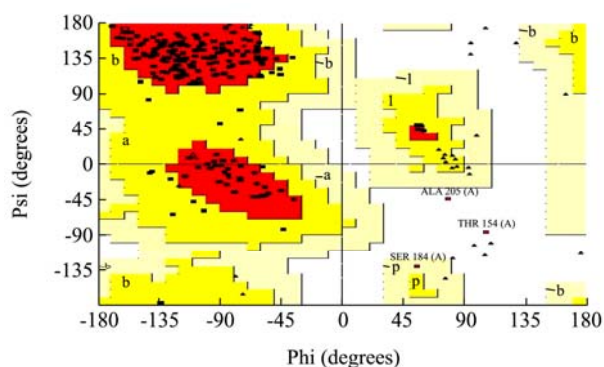


图 2 scFv 抗体的 Ramachandran 图

Fig.2 Ramachandran plot for scFv

Chiron 优化后对该模型进行 Procheck 程序评估, Ramachandran plot (图 2) 显示模型中 90.3%的氨基酸位于核心区域, 8.2%的氨基酸位于允许区域, 0.5%的氨基酸位于最大允许区, 只有 1%的氨基酸位于扭转角的禁止区域。该单链抗体模型中 99%蛋白质残基的二面角都在合理的范围之内,符合立体化学能量规则。Verify 3D 分析显示单链抗体模型中 97.07%的氨基酸残基的 3D-ID 平均分数都大于 0.2,模型通过了 Verify 3D 检测。ERRAT 分析显示综合得分为 96.29。因此,构建的单链抗体模型能够用于与 Cry2Aa 抗原的分子对接分析。

2.3 分子对接模拟分析

在同源建模所得 Cry2Aa 单链抗体三维结构的基础上,利用生物信息学技术将构建模型结构与 Cry2Aa 分子进行对接计算,对接结果见图 3。

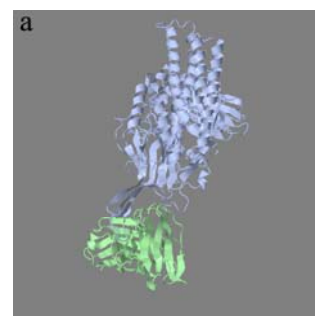


图 3 Cry2Aa 与单链抗体分子对接结果

Fig.3 Docking results for Cry2Aa and the scFv antibody

注:图 a 中蓝色为 Cry2Aa 分子,绿色为单链抗体;图 b 中粉色球体为单链抗体上的结合位点,绿色短键为 Cry2Aa 结合残基。

进一步分析显示 V_H -CDR2 区域 Asn81、Tyr82 残基和 Cry2Aa 毒素 domain II Gly458、Gly459、Ala460、Arg461 残基对接; V_H -CDR3 区域的 Ser121、Gly122、Asn123、Tyr124 同样和毒素 domain II 结合,结合残基为 Ile323、Gly324、Gly325 和 Leu326; V_L -CDR3 区 Tyr245、Ser246、Ser247、Asn248 和毒素 Val387、Aal388、Thr389、Ser390、Asn392 结合。在该体系中,表面静电力作用、氢键和分子间疏水相互作用是影响识别及结合稳定性的重要因素。

2.4 标准曲线的建立

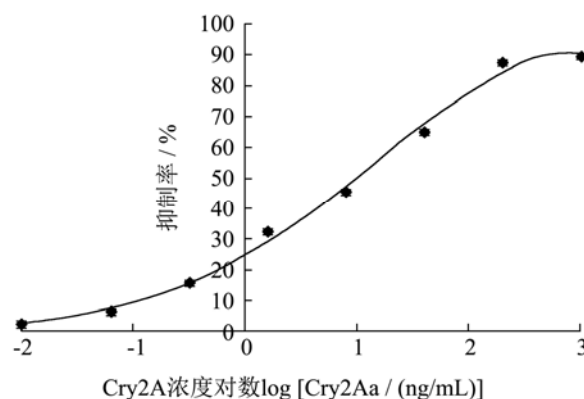


图 4 Cry2Aa 间接竞争 TRFIA 标准曲线

Fig.4 Standard curve for the indirect competitive TRFIA of Cry2Aa

用竞争时间分辨荧光免疫分析法,建立了 Cry2Aa

的标准抑制曲线 (图 4), 线性回归方程为 $IC=19.754 \text{ Log } C+32.171$ ($R^2=0.966$)。检测限 IC_{10} 为 0.08 ng/mL, 检测范围 $IC_{20}\sim IC_{80}$ 为 0.24~263.77 ng/mL, 半数抑制率 IC_{50} 为 7.99 ng/mL。

2.5 大米样品检测

在空白大米中添加 100 ng/mL、50 ng/mL、25

表 1 TRFIA 和 ELISA 法检测 Cry2Aa 的回收率

Table 1 Cry2Aa recovery as determined by TRFIA and ELISA

添加浓度/(ng/mL)	检测浓度/(ng/mL)		回收率/%	
	TRFIA	ELISA	TRFIA	ELISA
100	88.03±0.08	86.52±0.12	88.03	86.52
50	42.13±0.11	41.58±0.21	84.26	83.16
25	19.87±0.14	20.15±0.24	79.48	80.6
5	3.97±0.26	3.89±0.22	79.4	77.8

3 结论

3.1 以抗体结晶结构 (PDB IDs:2GHW) 为模板, 采用同源建模方法构建了 Cry2Aa 毒素单链抗体的三维结构, 通过生物信息学方法进行分子对接, 预测了 Cry2Aa 毒素与单链抗体结合的重要功能残基, 单链抗体的活性结合位点分别由 $^{81}\text{NY}^{82}$ 、 $^{121}\text{SGNY}^{124}$ 、 $^{245}\text{YSSN}^{248}$ 等氨基酸残基组成, 以上结合位点与毒素蛋白结构 II 区域结合, 证明该单链抗体可以较好的识别 Cry2Aa 毒素抗原。本研究为深入认识 Cry2Aa 毒素与其抗体分子识别机制提供了理论指导。

3.2 建立了基于单链抗体的时间分辨荧光免疫分析技术检测大米样品中 Cry2Aa 毒素方法。在添加范围内回收率为 77.8~88.03%, 该方法 $IC_{50}=7.99$ ng/mL, 检测范围 $IC_{20}\sim IC_{80}$ 为 0.24~263.77 ng/mL, 检测限 IC_{10} 为 0.08 ng/mL, 且与常规 ELISA 法检测呈良好的线性关系, 说明该方法可以在实际中检测 Cry2Aa 毒素。该方法的检测限还受限于单链抗体的亲和力, 后期将针对结合区域尝试结合定点突变、DNA Shuffling 等技术来进一步改善该单链抗体的特性。

参考文献

- [1] Bravo A, Likitvivanavong S, Gill S S, et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide [J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 2011, 41(7): 423-431
- [2] Hung T P, Truong L V, Binh N D, et al. Persistence of detectable insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, (Cry) and toxicity after adsorption on contrasting soils [J]. *Environmental Pollution*, 2015, 208: 318-325
- [3] Bretschneider A, Heckel D G, Pauchet Y. Three toxins, two

ng/mL 和 5 ng/mL 四个不同含量的 Cry2Aa 毒素标准品, 提取后采用上述 TRFIA 方法检测同时用常规双夹心 ELISA 方法检测验证。结果见表 1。从表中可以看出在上述毒素回收率分别为 79.48~88.03% 和 77.8~86.52%。对两种方法的检测结果进行线性回归分析, 其相关系数为 0.9536, 表明两种方法相关性较好。

receptors, one mechanism: Mode of action of Cry1A toxins from *Bacillus thuringiensis*, in *Heliothis virescens* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 76: 109-117

- [4] Zúñiga-Navarrete F, Gómez I, Peña G, et al. Identification of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin domain II loop 1 as the binding site of *Tenebrio molitor* cadherin repeat CR12 [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 59: 50-57
- [5] Yu L S L, Reed S A, Golden M H. Time-resolved fluorescence immunoassay (TRFIA) for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, 49(1): 63-68
- [6] Yang Q, Zhu J, Fei M, et al. Quantitative determination of major capsaicinoids in serum by ELISA and time-resolved fluorescent immunoassay based on monoclonal antibodies [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016, 81: 229-235
- [7] 徐重新, 杨晶祎, 陆梦晓, 等. 间接竞争时间分辨荧光免疫分析法检测稻米中 Cry1C 毒素 [J]. *南京农业大学学报*, 2014, 37(6): 44-48
- XU Chong-xin, YANG Jing-yi, LU Meng-xiao, et al. Indirect competitive TRFIA (CI-TRFIA) method development for the determination of Cry1C toxin in rice [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2014, 37(6): 44-48
- [8] Cruz S D L, Cubillos-Zapata C, López-Calleja I M, et al. Isolation of recombinant antibody fragments (scFv) by phage display technology for detection of almond allergens in food products [J]. *Food Control*, 2015, 54: 322-330
- [9] Wang Y, Zhang X, Zhang C, et al. Isolation of single chain variable fragment (scFv) specific for Cry1C toxin from human single fold scFv libraries [J]. *Toxicon*, 2012, 60(7): 1290-1297

- [10] Xu Z L, Shen Y D, Beier R C, et al. Application of computer-assisted molecular modeling for immunoassay of low molecular weight food contaminants: A review [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 647(2): 125-36
- [11] 王耘,刘贤进,刘媛,等.时间分辨荧光免疫法测定土壤中 Cry1Ac 毒素[J].*江苏农业学报*, 2012,28(5):1157-1162
- WANG Yun, LIU Xian-jin, LIU Yuan, et al. Time-resolved fluorescence immunoassay (TRFIA) for determination of Cry1Ac in soil [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 28(5): 1157-1162

现代食品科技